

## **БИОХИМИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ ОБЗОР**

УДК 612.822.1:[547.95:547.943].014.46:577.175.829

©Балашов, Панченко

### **АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРНЫХ СИСТЕМ. I. КООПЕРАТИВНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ.**

*А.М.Балашов<sup>1</sup>, Л.Ф.Панченко<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Московский НИИ психиатрии Минздрава России, 107076 Москва, ул.  
Потешная, 3; тел./факс - 963 7249;

<sup>2</sup>НИИ наркологии Минздрава России, Москва, Малый Могильцевский пер., 3

Исследования аллостерической регуляции рецептирующих структур представляются одним из бурно развивающихся направлений в современной рецептологии, представленным тысячами публикаций в научной литературе. Биохимические механизмы, обеспечивающие функционирование сердечно-сосудистой, нервной, иммунной, эндокринной и других систем организма, в значительной степени представлены аллостерическими процессами. В основе фармакологической активности многих лекарственных средств лежит их активность как аллостерических регуляторов рецепторов. Вместе с тем, представленные в оригинальных публикациях данные подчас имеют фрагментарный характер, что вызывает необходимость обобщения результатов, тем более что обзорные статьи по этому вопросу в отечественной литературе практически отсутствуют.

В настоящем обзоре рассмотрены исторические, методические, классификационные, функциональные аспекты аллостерической регуляции рецепторов. Положив в основу классификации критерий взаиморасположения ортостерического и аллостерического связывающих центров, авторы выделили специфическое, неспецифическое, функциональное аллостерическое воздействие, кооперативное взаимодействие. В работе суммированы результаты по аллостерической регуляции рецепторов катионами металлов. Описаны механизмы рецепции агонистов и антагонистов рецепторов, установленные с привлечением данных по аллостерической регуляции.

**Ключевые слова:** рецепторы, аллостерическая регуляция, кооперативное взаимодействие

**ВВЕДЕНИЕ.** Конформационные изменения биологических молекул лежат в основе процессов, обеспечивающих жизнедеятельность организма. Любая ферментативная реакция, по сути, являющаяся транслокацией атомов или электронов в системе субстрат-продукт, реализуется за счет взаимных конформационных изменений фермента и субстрата, возникающих вследствие их взаимодействия в активном центре [1]. Конформационные изменения макромолекул на разных уровнях лиганд-зависимой регуляции транскрипции

лежат в основе экспрессии генов [2], синтеза белка на рибосомах [3]. Конформационные процессы являются составной частью механизмов функционирования клеточного [4] и гуморального звеньев иммунной системы [5]. Функциональная активность гормональных и медиаторных рецепторов обеспечивается пострецепторными процессами, пусковым звеном которых является изменение конформации эффекторной части рецептора, формирующейся вследствие химического взаимодействия лиганда со специфическим связывающим участком [6].

Вместе с тем, в литературе описаны случаи, когда конформационные изменения в биологической макромолекуле возникают при связывании с химическим агентом в локусе, отличном от участка, отвечающего за основную активность (связывающий центр рецептора или активный центр фермента). При этом наблюдается изменение как связывания лиганда (субстрата) со специфическим участком, отражающееся в определенных изменениях кинетических характеристик (см. раздел "Методы выявления аллостерической регуляции рецепторов"), так и функциональной активности, регистрируемой биохимическими или физиологическими методами. Такой тип взаимодействия с рецепторной макромолекулой требует наличия особого места связывания, отличающегося от основного и вследствие этого получившего название аллостерического участка. В энзимологии подобный механизм модификации ферментной активности описан достаточно давно, что привело к формированию устойчивых современных представлений об аллостерически регулируемых ферментах.

К настоящему времени известно о существовании аллостерических процессов в регуляции функционирования различных систем организма. Имея универсальный характер, аллостерическая регуляция встречается у прокариот при обеспечении таких функций как хемотаксис [7], активный транспорт железа [8], транскрипционные процессы [9].

Аллостерическая регуляция различных звеньев экспрессии генов сохраняется у эукариот, в том числе в механизмах действия гормонов, имеющих внутриклеточные рецепторы [10]. Аналогичные регуляторные влияния реализуются на различных гуморальных и тромбоцит-зависимых стадиях гемостаза [11, 12]. Отдельные фазы иммунного ответа контролируются по аллостерическому регуляторному механизму [13]. Наибольший массив информации в научной литературе по аллостерической регуляции имеет отношение к рецептирующим структурам.

Учитывая широкую распространенность аллостерических регуляторных процессов в организме, мы не ставим задачи всестороннего рассмотрения проблемы. В настоящем обзоре мы попытаемся проанализировать и систематизировать данные литературы по аллостерической регуляции центральных и периферических рецепторов, сфокусировав внимание на сравнении разных видов модуляции на молекулярном уровне.

### **1. Исторические аспекты проблемы аллостерической регуляции рецепторов.**

В историческом плане явление аллостерической регуляции рецепторов представляет интерес, прежде всего тем, что использование аллостерических регуляторов в медицинской практике началось раньше, чем появились первые научные публикации, объясняющие механизм их действия. Речь идет о бензодиазепиновых транквилизаторах, которые получили широкое распространение уже в 60-х годах XX века. В 1975 году среди опубликованных результатов 821 исследования, посвященных бензодиазепинам, в двух работах впервые были представлены доказательства вовлеченности ГАМК-ергической системы в эффекты транквилизаторов [14, 15]. Через 5 лет, в 1980 году появились публикации, в которых предполагался аллостерический характер взаимодействия производных бензодиазепина с ГАМК-ергическим рецепторным комплексом [16, 17]. К настоящему времени накоплены многочисленные результаты, в том

## АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

числе мультидисциплинарных исследований, которые позволяют считать установленным аллостерический механизм фармакологического действия бензодиазепинов [18].

Справедливости ради, необходимо отметить, что впервые термин "аллостерический" был применен в конце 60-х годов по отношению не к бензодиазепиновым, а к ацетилхолиновым рецепторам. Теоретическая работа А. Karlin имела целью объяснить результаты физиологических и фармакологических экспериментов, которые не укладывались в постулаты классической теории рецепторного взаимодействия, вытекающей из закона действующих масс и устанавливающей отношения между действующей концентрацией лиганда и биологическим эффектом [19]. Автор предложил "вероятностную" модель рецептора ацетилхолина, введя понятие о множественности связывающих лиганд участков, способных к взаимному влиянию. Эти представления, по сути, квалифицирующие взаимодействие ацетилхолина с рецептором как кооперативное, получили развитие в последующих двух статьях, вышедших более чем через 5 лет после первой [20, 21]. Тогда же была опубликована математическая работа, обращавшая внимание исследователей на необходимость различия механизмов кооперативного и аллостерического влияния на рецепторы [22].

К настоящему времени феномен аллостерической регуляции описан для рецепторов практически всех известных медиаторных систем [23]. Интерес исследователей к этой проблеме постоянно возрастает, о чем свидетельствует динамика количества публикаций, посвященных явлению аллостерии (см. табл. 1).

Таблица 1. Публикации по аллостерической регуляции рецепторов.

Годы	Кол-во публикаций	Годы	Кол-во публикаций
до 1978	38	1998	141
1978 – 1982	65	1999	127
1983 – 1987	213	2000	163
1988 – 1992	373	2001	161
1993 – 1997	537	2002	169

Не претендуя на полное изложение всех имеющихся данных по проблеме аллостерической регуляции рецепторов, мы попытаемся систематизировать процессы, на сегодняшний день рассматривающиеся как "аллостерические".

Анализ научных статей позволяет заключить, что исследования аллостерической регуляции рецепторов развиваются по нескольким основным направлениям:

- феноменология аллостерической регуляции;
- изучение строения рецепторных комплексов;
- изучение строения собственно регуляторных участков рецепторов;
- синтез и изучение свойств новых аллостерических регуляторов;
- поиск эндогенных аллостерических регуляторов;
- функциональная значимость аллостерической регуляции;
- роль аллостерических регуляторов в патогенезе заболеваний;
- клинические аспекты применения аллостерических регуляторов

рецепторов.

### 2. Методы исследования аллостерического взаимодействия веществ с рецепторами.

Суть методических подходов, используемых при исследовании аллостерического взаимодействия, заключается в применении адекватного математического аппарата обработки экспериментальных данных. На первом этапе регистрируется зависимость "доза-эффект" при взаимодействии лиганда с рецептором в присутствии аллостерического модулятора. В качестве "эффекта" (Е) может выступать как первичный биохимический параметр, например, уровень рецепторного взаимодействия, так и любые иные биохимические и

физиологические реакции, обусловленные пострецепторными процессами. Определения могут проводиться в двух вариантах: равновесного и неравновесного кинетического исследования. В основе представления результатов лежит закон действующих масс и вытекающее из него уравнение (1)

$$E = E_{\text{макс}} \cdot [L] / [L] \cdot K_D \quad (1)$$

где  $E_{\text{макс}}$  - максимальный эффект,  $E$  - эффект при концентрации лиганда  $L$ ,  $K_D$  - равновесная константа диссоциации.

Необходимость применения конкретной последующей математической обработки вытекает из направленности регулирующего влияния тестируемого соединения, а именно активации или ингибирования. Подробно математический аппарат для анализа вариантов лиганд-рецепторного взаимодействия описан в ряде изданий [24], поэтому в настоящем обзоре мы лишь кратко коснемся принципиальных вопросов оценки именно аллостерического взаимодействия.

*Положительная аллостерическая регуляция* рецепторов выражается в увеличении уровня рецепции лиганда в присутствии тестируемого вещества и представляет собой наиболее простой случай для анализа. Влияние модулятора может приводить к искажению изотермы "доза-эффект" с появлением на кривой участков, извращающих ее монотонный характер. Для количественной оценки эффективности модулятора при *равновесном анализе* используется линеаризация данных путем преобразования Scatchard (уравнение 2), которое позволяет определить значение равновесной константы диссоциации в присутствии тестируемого соединения и максимальную величину эффекта. На практике при положительном аллостерическом влиянии отмечают как уменьшение  $K_D$  (увеличение сродства рецепторов), так и увеличение  $E_{\text{макс}}$  (см. ниже). Для верификации эффекта используют и другие способы линеаризации изотермы "доза-эффект". Преобразование Lineweaver-Burk (уравнение 3) позволяет получать информацию, аналогичную преобразованию Scatchard. Преобразование Hill (уравнение 4) дает возможность выявлять феномен положительной "кооперативности" при наклоне изотермы, превышающем единицу. Сходным образом степень "кооперативного" взаимодействия можно оценить из графика Shild (уравнение 5), где  $L'$  - эквипотенциальная концентрация лиганда ( $L$ ) в присутствии модулятора  $M$ . Перечисленные подходы имеют равноправное применение.

$$E/[L] = E/K_D + E_{\text{макс}}/K_D \quad (2)$$

$$1/E = K_D/E_{\text{макс}} \cdot [L] + 1/E_{\text{макс}} \quad (3)$$

$$\lg[E/E_{\text{макс}} - E] = \lg[L] - \lg K_D \quad (4)$$

$$\lg[L'/L] = \lg[M] - \lg K_D \quad (5)$$

*Неравновесные кинетические* исследования, выявляющие динамику комплексообразования рецептор-лиганд, позволяют оценивать константы скоростей прямой и обратной реакций. В случае положительной модуляции в качестве причины увеличения сродства рецепторов исследователи обнаруживают как увеличение константы ассоциации, так и уменьшение константы диссоциации (см. ниже).

При исследовании *отрицательной аллостерической регуляции* используются те же математические приемы, что и при оценке положительной аллостерической регуляции, однако регистрируются противоположные изменения. Анализ осложнен тем обстоятельством, что выявляемый эффект заключается в ингибировании рецепции, и, следовательно, необходимо дифференцировать конкурентное и аллостерическое взаимодействие, вызывающие однонаправленные изменения, например, в величине  $K_D$ . Затруднения трактовки вызывает также то, что часто исследования проводятся на гетерогенной популяции рецепторов, и получаемые изотермы имеют нелинейный характер. На практике вывод в пользу аллостерического механизма ингибирования рецепции делается на основании сочетания различных способов обработки результатов; особое

### АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

доказательное значение имеют исследования в условиях неравновесной кинетики.

В последнее время появились публикации, авторы которых предлагают использовать моделирование Маркова для верификации экспериментальных данных, полученных при изучении аллостерической регуляции [23]. Этот подход с позиций математической статистики позволяет проводить количественную оценку выраженности ингибирования или активации рецепторов; он особенно показан при анализе бифазно протекающих процессов. С его помощью были, например, верифицированы данные по аллостерической регуляции никотиновых рецепторов [25].

Помимо математической методологии применяется семантический подход, основным инструментом которого являются качественные реакции (наличие или отсутствие активности), регистрируемые с использованием методов направленного мутагенеза. Успехи, достигнутые международной программой "Геном человека" в расшифровке строения генов, открыли новые перспективы для исследования структуры рецепторов, и в частности, их связывающих центров. Эксперименты развиваются по двум принципиальным направлениям: (а) направленный мутагенез с замещением одного или более аминокислотных остатков, входящих в состав связывающих центров или исследующихся в этом плане и (б) синтез отдельных субъединиц рецепторов с последующим созданием химерных рецепторов, функционирующих в искусственных системах. Ниже мы приводим многочисленные данные исследований, в которых показано, что аллостерический регуляторный эффект обуславливается аминокислотными остатками, отличными от тех, которые входят в состав активного центра рецепторов.

#### 3. Неспецифическая аллостерическая регуляция рецепторов.

Описанные методические подходы позволяют обрабатывать экспериментальные данные, получая информацию об аллостерическом характере влияния изучаемых веществ на рецептирующие молекулярные комплексы. Вместе с тем, адекватная трактовка результатов требует привлечения дополнительных знаний, позволяющих предполагать тот или иной конкретный механизм, по которому происходит регуляция рецепторов. В качестве иллюстрации одного из вариантов модуляции функций рецепторов рассмотрим некоторые аспекты действия алкоголя.

**Алкоголь.** Многочисленные данные литературы свидетельствуют, что этиловый спирт, в той или иной степени, способен изменять параметры практически всех исследованных рецепторов [26]. Наиболее вероятной причиной нарушений рецепции алкоголем представляется его неспецифическое мембранотропное действие, приводящее к изменению физико-химических характеристик мембран [27]. Вместе с тем, в научных публикациях можно встретить указания на "специфичное" влияние этанола на некоторые рецепторы, например, ГАМК<sub>A</sub> или P2X пуриновые [28, 29]. Иногда пишут о специфическом локусе для этанола на ГАМК<sub>A</sub>-рецепторе, обсуждают вопрос об аллостерических взаимодействиях между ГАМК, бензодиазепинами и алкоголем, исследуют вопросы конкурентного и аллостерического взаимодействия этанола и воды в организме [30]. Представления о специфичном аллостерическом взаимодействии этанола с ГАМК<sub>A</sub>-рецептором можно встретить в работах последнего времени (см. например [31]). Вывод об "аллостерическом" характере взаимодействия этилового спирта с некоторыми рецепторами обусловлен результатами, полученными вследствие анализа данных формально использованным математическим аппаратом, и он справедлив в том плане, что эффекты этанола не связаны с его взаимодействием в активном центре рецептора. Однако следует иметь ввиду указанный выше неспецифический характер влияния алкоголя на биологические мембраны и вторичность реакции мембраносвязанных компонентов клетки, а следовательно, малую вероятность наличия на рецепторах специального регуляторного локуса для этанола.

**Атмосферное давление.** Аналогичный формализованный подход используется некоторыми авторами для объяснения интересного феномена

обращения поведенческих реакций мышей на этанол, диазепам, *n*-пропанол (веществ, модулирующих ГАМК<sub>A</sub>-трансмиссию) гипербарическими условиями эксперимента [32]; аналогичные данные были получены впоследствии в отношении пентобарбитала, но не нейростероида 3-альфа-гидрокси-5-бета-прегнан-20-он или агониста ГАМК 4,5,6,7-тетрагидроизоксазол-пиридин-3-ол [33]. Авторами работ, исходящих из одной лаборатории, было сделано заключение, что повышенное атмосферное давление (12 АТА смесью гелия и кислорода) специфически обращает эффекты некоторых модуляторов ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов [34]. При этом упущены возможности объяснения экспериментальных данных с позиций термодинамики или кислород-зависимых процессов. Последнее представляется одной из вероятных причин, лежащих в основе обнаруженных эффектов, в пользу чего свидетельствуют результаты, что при гипоксии формируются противоположные изменения, т.е. активность указанных соединений усиливается [35].

**Кислотность.** Еще один пример. При биохимическом исследовании процессов комплексообразования рецептор-лиганд часто изучают рН-зависимость. Как и любой иной химический процесс в организме рецепторное взаимодействие, протекающее вблизи границы раздела фаз вода-липид, зависит от электростатического и стерического соответствия двух реагирующих молекул и характеризуется эволюционно обоснованным рН-оптимумом. Понятно, что нефизиологические величины рН, как минимум, вызывают значительные изменения ионизации функциональных групп рецепторной макромолекулы и уровня водородных связей между ее частями, а следовательно, приводят к нарушениям вторичной и третичной структуры белковой части рецептора. Поэтому справедливо будет полагать, что механизм влияния протонов на биохимические параметры рецепторного взаимодействия является неспецифическим, хотя формально соответствует понятию "аллостерический". Изложенное не отрицает ни феноменологии, ни возможной физиологической значимости регуляции различных процессов протонами, однако, трактовка результатов в плане предположений о наличии "специфического" центра связывания H<sup>+</sup> на рецепторах представляется нецелесообразной по сравнению с классическими взглядами биохимии на рН-зависимые процессы. Приведенные примеры свидетельствуют о необходимости дифференциации между аллостерическим и неспецифическим механизмами влияния на рецепцию, более того, существует необходимость в систематизации научных взглядов на проблему "аллостерической" регуляции рецепторов.

В современной научной литературе под единым термином "аллостерическое взаимодействие" нередко объединяют несколько разновидностей процессов, имеющих внешнее феноменологическое сходство и обнаруживаемых при помощи одинаковых методических подходов. Сходство здесь заключается в установленном факте изменения связывающей способности рецепторов под действием изучаемого агента и использованием расширенной (подчас механистической) трактовки полученных результатов. Выше мы показали возможность неспецифического влияния на рецепторы путем изменения текучести мембран или распределения электростатических зарядов. Более специфичное влияние на рецепцию оказывают вещества, чья регулирующая активность определяется особым участком связывания, который может не совпадать с первичным активным центром рецептора. Существующие варианты аллостерической регуляции обусловлены наличием и расположением локуса, обеспечивающего регуляторное влияние, а также его специфичности. Исходя из этих представлений, явление, описываемое в современной литературе как "аллостерическая регуляция" рецептирующих молекул, можно разделить на три группы, в каждой из которых влияние модулятора на рецептор обусловлено взаимодействием:

- с первичным активным центром;
- с центром на эффекторной субъединице (субъединицах);

## АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

· со специфическим регуляторным центром.

В настоящем обзоре мы остановимся на характеристике первых двух вариантов регуляции, а вопросы о специфической аллостерической регуляции будут обсуждаться во второй, самостоятельной части работы.

### 4. Кооперативное взаимодействие.

Возможность модуляции связывающей активности рецепторов собственными лигандами описана в литературе раньше других видов аллостерической регуляции. Сущность феномена заключается в регистрируемом факте вариабельности сродства рецептора, которое является функцией действующей концентрации лиганда. При этом подразумевается субъединичное строение рецепторного комплекса с наличием нескольких равноценных связывающих центров или тесное взаимодействие нескольких рецепторов, несущих по одному связывающему центру. Рецепция лиганда в одном из них вызывает конформационные изменения в ассоциированных субъединицах с соответствующими изменениями сродства. Этот вид быстрой, несвязанной с синтезом, регуляции - кооперативное взаимодействие - достаточно широко распространен. В 1977-1978 годах была описана отрицательная кооперативность при рецепции инсулина [36] и положительная кооперативность при связывании рилизинг фактора гонадотропина в передней доле гипофиза [37]. Для инсулина было показано, что кооперативное взаимодействие (но не связывание рецепторами) обусловлено С-концевым восьмичленным фрагментом В-цепи и остатком аспарагина-21 А-цепи его молекулы [38].

Известные к настоящему времени результаты о кооперативном характере взаимодействия некоторых лигандов с собственными рецепторами суммированы в таблице 2. Представлены данные о доказанных случаях кооперативного взаимодействия рецепторов с лигандами при изучении рецепции только одного вещества. Помимо этого имеется значительный массив информации об изменении

Таблица 2. Кооперативный характер взаимодействия лигандов с некоторыми рецепторами.

Рецептор	Лиганд	Эффект	Ссылка
инсулина	инсулин	-	[36]
гонадолиберина	гонадолиберин	+	[37]
мускариновый	ацетилхолин	+	[39]
тиреотропина	тиреотропный гормон	-	[40]
эстрогенов	эстрадиол	+	[41]
клеток HeLa	аденовирус 2	+	[42]
витамина D3	дигидроксид витамина D3	+	[43]
ГАМК	мусцимол	.*	[44]
андрогенов	5-α-дигидротестостерон	+	[45]
ангиотензина	ангиотензин II и III	+	[46]
рианодиновый	рианодин	-	[47]
аспарагиновый**	аспартат	-	[48]
имидазолиновый I <sub>2</sub>	идазоксан	+/-***	[49]
интерлейкина II	интерлейкин II	+	[50]
никотиновый	ацетилхолин	-	[51]
каннабиноидов CB1	Δ9-тетрагидроканнабинол	-	[52]
для cAMP**	cAMP	-	[9]
аденозиновый A1	аденозин	-	[53]
инозитола IICR	инозитолтрифосфат	+	[54]

Примечание: Плюс означает положительное; минус - отрицательное кооперативное взаимодействие. \* - выраженность эффекта зависит от температуры, \*\* - рецептор прокариот, \*\*\* - направленность эффекта зависит от концентрации лиганда

активности рецептора для конкретного лиганда в присутствии другого лиганда (конкурентного агониста или антагониста), реагирующего с тем же связывающим центром. Этот вариант кооперативного взаимодействия мы здесь не рассматриваем.

Приведенный в таблице 2 перечень охватывает различные рецептирующие структуры, среди которых представлены рецепторы медиаторов, пептидов, внутриклеточные и внутриядерные рецепторы, рецепторы иммунокомпетентных клеток. Хотя кооперативное взаимодействие имеет широкое распространение в организме, его физиологический смысл остается неясным. Можно предполагать, что кооперативные процессы, являясь одним из регуляторных механизмов, имеют отношение к поддержанию функционального гомеостаза рецепторных систем.

Один из вариантов регуляции по кооперативному механизму описан Viemann и Koshland Jr. (1994) для аспарагинового рецептора прокариот, отвечающего за хемотаксис, и характеризуется авторами как "пределный случай отрицательной кооперативности" [48]. В присутствии медиатора половина рецепторов *E. coli* приобретала конформацию, приводящую к отсутствию способности к связыванию. Интересно отметить, что рецепторы *S. typhimurium*, для которых нехарактерен подобный тип регуляции, приобретали свойства рецепторов *E. coli* после направленного мутагенеза с заменой остатка серина-68 на остаток аспарагиновой кислоты [55]. Регуляция половины связывающих участков отмечена у эукариот в отношении N-холинорецепторов и опиоидных рецепторов  $\delta$ -,  $\mu$ - и  $\kappa$ -типа, причем модуляторы проявляли как отрицательную, так и положительную аллостерическую активность [56, 57]. Эти данные становятся понятными, если предположить, что перечисленные рецепторные комплексы существуют в виде димеров, и взаимодействие с одним из связывающих участков вызывает конформационные изменения в другом, приводя в результате к регистрируемым нарушениям аффинитета для 50% рецепторов.

Невзирая на имеющиеся различия в направленности регуляторных процессов и иные проявления количественного характера, необходимо отметить то общее, что присуще любому из перечисленных случаев кооперативного взаимодействия: модуляция всегда выражается в изменении сродства активного центра. В совокупности рассмотренные результаты о "кооперативной" составляющей в рамках лиганд-рецепторного взаимодействия позволяют сделать заключение о возможном существовании механизма быстрой регуляции рецепторов *in situ* собственными лигандами. Наличие разнонаправленных процессов и ограниченный характер имеющихся наблюдений не позволяют сделать более определенные предположения, хотя разнообразие рецепторов, для которых описано кооперативное взаимодействие, дает основание думать об универсальности регуляции этого типа.

##### 5. Функциональная аллостерическая регуляция рецепторов.

Одной из особенностей структурно-функциональной организации синапса является наличие путей нейтрализации медиатора. В этом направлении функционируют ферментные системы деградации лигандов вблизи места их действия, транспортеры обратного захвата, которые представляют собой средства для удаления избыточного количества медиатора, выброшенного в синаптическую щель. Вместе с тем, возможности указанных регуляторных механизмов ограничены по отношению к молекулам лиганда, связанным с рецепторами. Представляется вероятным, что по аналогии с ферментами, активность которых во многих случаях ингибируется продуктом реакции, рецепторы могут регулироваться веществами, действующими через их эффекторную часть, для минимизации негативных последствий гиперстимуляции. В этом может заключаться физиологический смысл рассматриваемого в настоящем параграфе варианта аллостерической регуляции рецепторов.

Согласно современным представлениям, информация, переданная клетке химическим путем через взаимодействие лиганда с рецептором,



### АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

трансформируется во внутриклеточный сигнал. Первичным макромолекулярным комплексом, воспринимающим этот сигнал внутри клетки и передающим его далее, является эффектор, расположенный на внутренней стороне цитоплазматической мембраны. Роль эффекторной части рецептора могут выполнять различные биохимические структуры, прежде всего, ионные каналы и белки, чувствительные к гуаниновым нуклеотидам (G-белки) [24]. Для рассматриваемого вопроса важно подчеркнуть, что основой эфферентного переноса информации через мембрану от воспринимающей до действующей части рецептора являются конформационные изменения макромолекулярного комплекса. Естественно полагать, что коль скоро конформационные процессы возникают во внутриклеточной части рецептора после взаимодействия лиганда с его внеклеточным доменом, то вероятным представляется обратный процесс: перестройки активного центра могут быть индуцированы первичными медиаторами внутриклеточного ответа. Рассмотрим примеры, иллюстрирующие справедливость этого предположения.

*Алlostерическая регуляция рецепторов гуаниновыми нуклеотидами.* Многочисленные исследования, свидетельствующие о зависимости связывающей активности рецепторов от гуаниновых нуклеотидов (ГН), позволили сформулировать положение о том, что связывание агонистов в активном центре рецепторов, с одной стороны, и связывание GTP и его аналогов с G-белками, с другой, характеризуются следующими взаимоотношениями: ГН обладают ингибирующим, а агонисты активирующим действием [58]. В рамках настоящего обзора укажем на данные о способности ГН алlostерически модулировать рецепцию лигандов.

К нуклеотидам чувствительны рецепторы некоторых моноаминовых медиаторных систем. ГН ингибируют связывание агонистов с серотониновыми (5-HT) рецепторами подтипа 5-HT-1A, снижая количество доступных для лиганда связывающих участков [59]. Ингибирующее действие нуклеотидов обнаружено также в отношении серотониновых рецепторов 5-HT-2-типа [60], тогда как 60% 5-HT-7A рецепторов являются ГН-резистентными [61]. GTP и аналоги ингибируют взаимодействие агонистов с  $\alpha_2$ -адренорецепторами, при этом отмечается снижение аффинитета, тогда как связывание антагонистов стимулируется как вследствие уменьшения величины  $K_D$ , так и увеличения количества связывающих участков [62]. ГН обращают некоторые эффекты дофамина, опосредованные D1-рецепторами [63]. Угнетение рецепции лигандов нуклеотидами показано на примере мускариновых рецепторов подтипа M2 [64].

Функциональная активность некоторых модуляторных систем зависит от ГН. Следствием алlostерического ингибирования гуаниновыми нуклеотидами рецепции агонистов A1-аденозиновыми рецепторами, как и в случае с 5-HT-1A подтипом серотониновых рецепторов, также является уменьшение количества доступных для связывания активных центров [59]. Ингибирование под действием ГН характерно для опиоидных рецепторов  $\delta$ -,  $\mu$ 1-,  $\mu$ 2-,  $\kappa$ -типов [57]. Интересно отметить, что рецепторы к ноцицептину, известные как опиоидоподобные (opioid receptor-like receptor), также чувствительны к алlostерическому ингибированию ГН [65]. ГН алlostерически угнетают связывание с соответствующими рецепторами нейропептида Y, но не его антагонистов [66], тромбина [67] лейкотриена B4 [68], каннабиноидов, но не их антагонистов [69], веществ, взаимодействующих с хемокиновыми рецепторами CCR5 [70].

В настоящее время мы наблюдаем ситуацию, при которой происходит накопление научных данных по вопросу регуляции рецепторов гуаниновыми нуклеотидами, но уже сегодня можно сделать некоторые предварительные обобщения. Способность ГН к модификации связывания лигандов не зависит от молекулярной структуры конкретных рецепторов, которые могут принадлежать к разным суперсемействам, однако, сопряжены с гуанин-чувствительными белками. Вместе с тем, нуклеотиды оказывают принципиально однонаправленное действие

на связывание лигандов, что справедливо, по крайней мере, для агонистов (ниже мы более подробно рассматриваем вопросы рецепции агонистов и антагонистов). Феноменологически эффект ГН может проявляться не только в снижении сродства, как это было характерно для описанного выше случая кооперативного взаимодействия, но и уменьшении количества, связывающих лиганды участков, т.е. степень регулирующего влияния может быть выражена по принципу "все или ничего". Изложенное дает основания полагать, что мы имеем дело с особой разновидностью группоспецифической аллостерической регуляции метаботропных рецепторов с точкой приложения активности на эффекторе - функциональной субъединице рецептора, - поэтому уместным выглядит обозначение этого вида регуляции как "аллостерической функциональной".

Если для G-белок-зависимых метаботропных рецепторов характерна чувствительность к ГН, то можно ожидать, что функциональная аллостерическая регуляция ионотропных рецепторов представляет собой зависимость связывающей активности от воздействия на ассоциированные с ними ионные каналы.

*Аллостерическая регуляция рецепторов соединениями, взаимодействующими с ионными каналами.* В клинической и исследовательской практике используется ряд веществ, механизм действия которых связан с влиянием на ионные каналы, сопряженные с различными рецепторами. В экспериментах связывание этих соединений с ионофорами используется в качестве критерия функциональной активности ионотропных рецепторов и определяется при изучении потенциальных лигандов рецепторов и их модуляторов. Значительно меньше исследован вопрос об обратном влиянии. В таблице 3 приведены сведения об отдельных веществах и фармакологических группах соединений, активных в отношении ионных каналов, и для которых в научной литературе имеются сведения в плане их способности модифицировать рецепцию лигандов.

Таблица 3. Соединения, взаимодействующие с лиганд-зависимыми каналами.

Вещества	Ионофор	Рецептор
Местные анестетики	Натриевый	Никотиновый
Общие анестетики	Натриевый	Никотиновый
Дизоцилпин	Кальциевый	NMDA
Полиамины	Кальциевый	AMPA
TBPS	Хлорный	ГАМК
АТР	Калиевый	SUR

Рассмотрим действие представленных в таблице 3 соединений более подробно. Считается, что основной точкой приложения активности местных анестетиков являются потенциал-зависимые Na-каналы. Вместе с тем, имеются доказательства вовлеченности в механизм действия этих соединений лиганд-зависимых каналов, главным образом, формируемых никотиновыми рецепторами; при этом установлено, что участок, связывающий местные анестетики, расположен непосредственно на канале [71]. С рассматриваемых позиций местные анестетики представляют собой функциональные аллостерические ингибиторы N-холинорецепторов, реализующие свое действие через блокаду ионофора [72]. Вместе с тем, их влияние на кинетические параметры рецепции лигандов никотиновых рецепторов выявляет более комплексный характер регуляции. В одном из ранних исследований, посвященных взаимодействию местных анестетиков с ацетилхолином, было установлено, что модуляторы стабилизируют N-холинорецептор в конформации, высокоаффинной по отношению к лигандам [73]. Более того, непосредственное определение кинетики связывания ацетилхолина позволило заключить, что местные анестетики повышают сродство рецепторов к лиганду [74]. Следует иметь в виду, что позитивная модуляция связывания способствует быстрейшему наступлению десенситизации рецептора и,

### АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

в конечном итоге, срабатывает в том же направлении, что и блокада канала. Интересно отметить, что по отношению к М-холинорецепторам местные анестетики демонстрируют иной механизм регуляции. В этом случае, являясь негативными аллостерическими модуляторами активного центра, они ингибируют вызванную лигандом десенситизацию рецепторов, и их активность не обусловлена взаимодействием с  $\text{Ca}^{2+}$ -каналом [75].

Множество точек приложения активности соединений, относящихся к другой фармакологической группе - общих анестетиков, включает в себя специфический участок на канале N-холинорецептора [76]. На примере синтетического фотоактивирующегося соединения 3-(2гидроксиэтил)3-*N*-пентилдиарецина показана способность общих анестетиков аллостерически негативно модулировать активность лигандов [77].

В структуре сложного комплекса NMDA-рецептора, сопряженного с кальциевым каналом, присутствует центр связывания производных фенциклидина. Этот центр, широко используемым лигандом которого является дизоцилпин (МК-801 или (+)-5-метил-10,11-дигидрокси-5Н-дибензоциклопентен-5,10-имин), расположен на участке, формирующем канал рецептора [78]. Хотя МК-801 не оказывает эффекта, например, в тесте по высвобождению ацетилхолина, это соединение блокирует стимулирующий эффект глутамата [79]. Аллостерический характер негативного влияния МК-801 на рецепцию лигандов в глутаматном локусе NMDA-рецептора показан на различных моделях [80] и реализуется через уменьшение количества активных центров [78].

Полиамины, такие как спермин, спермидин, филантотоксин, способны ингибировать глутаматные рецепторы AMPA типа в том случае, если в их состав не входит GluR2 субъединица, в присутствии которой кальциевый канал не формируется [81]. Показана способность полиаминов связываться с каналом, находящимся как в открытом, так и закрытом состоянии, блокируя активность лигандов AMPA-рецептора путем негативного аллостерического влияния этих соединений на первичный активный центр рецептора [82].

Бициклический конвульсант *t*-бутилбициклофосфонотионат (TBPS), чья фармакологическая активность обусловлена подавлением ГАМК-ергической трансмиссии, используется для оценки функциональной активности ГАМК-системы. Взаимодействие TBPS с ГАМК<sub>A</sub> рецепторным комплексом чувствительно к пикротоксину, а центр его связывания расположен на хлорном ионофоре [83]. В немногочисленных работах, посвященных влиянию TBPS показано, что конвульсант ингибирует амплитуду ответа на ГАМК, и для проявления его аллостерического действия необходимо наличие  $\alpha$  и  $\beta$ -субъединиц [84]. Более того, в ряду аналогичных конвульсантов наблюдается корреляция между способностью ингибировать ГАМК<sub>A</sub>-рецептор и аффинностью к TBPS-связывающим участкам [85]. Сведений о кинетических параметрах рецепции лигандов в первичном и других центрах ГАМК-рецептора в присутствии TBPS в доступной нам литературе не обнаружено.

В головном мозге и периферических органах присутствуют рецепторы (SUR), специфически взаимодействующие с производными сульфонилмочевины - негормональными сахаропонижающими веществами: глибенкламидом и аналогами [86]. Функциональная активность SUR обеспечивается сопряженным с ним АТР-зависимым К-каналом, который кодируется геном *Kir6.2*. Эти рецепторы аллостерически регулируются сложным образом адениновыми нуклеотидами, однако, их взаимодействие со связывающим участком на канале ингибирует рецепцию глибенкламида [87]. Эффект нуклеотидов является органоспецифичным и проявляется, например на SUR в желудочках сердца, но не аорте [88].

Таким образом, взаимодействие соединений с ионными каналами приводит к модификации связывания лигандов в активном центре сопряженных рецепторов. Как и в случае с ГН имеет место ингибирование. Можно полагать, что метаботропные и ионотропные рецепторы регулируются веществами,

связывающимися с их эффекторной частью; такой вид негативной аллостерической регуляции можно обозначить как функциональную.

*Аллостерическая регуляция рецепторов катионами металлов.* В дополнение к функциональной аллостерической регуляции ионотропных рецепторов можно ожидать, что они будут чувствительны к ионам, по крайней мере, тем, для которых формируются каналы. Вместе с тем, влияние ионов распространяется и на метаботропные рецепторы, что существенно отличает их от функциональных регуляторов. Существующие теории связывания веществ макромолекулами [24] предполагают наличие поливалентной области на рецепторе и комплиментарного участка на лиганде, обеспечивающих узнавание и взаимодействие. В простейшем случае рассматривается дивалентное связывание. На ионы это правило распространить без ограничений нельзя, например, все катионы могут взаимодействовать с доступными отрицательно заряженными группами аминокислотных остатков, вызывая изменения конформации макромолекулы, если данный остаток принимает участие в поддержании третичной и четвертичной структуры. При этом аффинность часто зависит от размера иона и плотности заряда. Приведенные ниже данные в ряде случаев можно трактовать с позиций неспецифического электростатического взаимодействия.

Впервые данные о регуляции натрием процессов комплексообразования рецептор-лиганд были описаны в середине 70-х годов XX века. В пионерской работе, выполненной в лаборатории S.H. Snyder, было показано, что  $\text{Na}^+$  изменяет связывающую активность опиоидных рецепторов, ингибируя связывание агонистов [89]. Авторы ввели понятие "натриевого сдвига" (sodium shift), т.е. сдвига кривой доза-эффект вправо в присутствии  $\text{Na}^+$ , как дискриминантной характеристики при биохимическом тестировании соединений на агонистическую-антагонистическую активность. Впоследствии эти данные были многократно подтверждены и уточнены. Так было показано, что натрий вызывает конформационные изменения макромолекулярного комплекса опиоидного рецептора [90], и эффект катиона не обусловлен его взаимодействием с G-белком [91]. С другой стороны, независимый от  $\text{Na}^+$  характер рецепции антагонистов был уточнен в кинетических экспериментах [92]. Оказалось, что при увеличении концентрации катиона его действие сначала проявляется в виде увеличения сродства антагониста, а затем уменьшения количества мест связывания [93]. Таким образом, при использовании физиологической концентрации натрия (условие, выполнявшееся в большинстве исследований) уровень связывания будет неизменным на фоне изменившихся параметров рецепции. Подобная кинетика наблюдается для  $\delta$ - и  $\mu$ -рецепторов и не характерна для  $\kappa$ -рецепторов [94]. Влияние натрия на связывание агонистов в качественном отношении одинаково для подтипов опиоидных рецепторов, хотя связывающие участки  $\delta$ -типа на два порядка менее чувствительны к действию катиона по сравнению с  $\mu$ -рецепторами [95].

Феномен "натриевого сдвига" описан для некоторых подтипов дофаминовых рецепторов. Натрий аллостерически ингибирует связывание агонистов с D2-рецепторами, понижая их сродство [96]. В то же время, на рецепцию антагонистов, в зависимости от их химической структуры, присутствие  $\text{Na}^+$  не влияет или, напротив, даже стимулирует [97]. Хотя данные о модификации натрием связывания лигандов с D4-рецепторами отсутствуют, известно, что этот катион на порядок снижает модулирующую активность  $\text{Zn}^{2+}$  (см. ниже), при этом замена аспарата-77 на остаток аспарагина полностью устраняет действие натрия [98]. Помимо влияния на рецепторы,  $\text{Na}^+$  модифицирует связывание лигандов с переносчиком дофамина. Направленность действия натрия зависит от условий определения, так в изотонической среде катион снижает связывание, а в гипертонической - вызывает увеличение аффинности к лигандам [99].

Натрий не изменяет параметры связывания антагонистов с каннабиноидными рецепторами, одновременно вызывая снижение сродства связывающих участков к агонистам (натриевый сдвиг), при этом эффект катиона

### АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

выражен тем сильнее, чем выше агонистические свойства лиганда [69]. Действие  $\text{Na}^+$  выявляется как на центральных (CB1), так и периферических (CB2) рецепторах [100]. Натрий снижает сродство лигандов к  $\alpha_2$ -адренорецепторам [101]; при направленной замене остатка аспартата-79 на аспарагин чувствительность рецепторов к катиону полностью устраняется [102].

В противоположность вышеизложенному, натрий выступает в роли позитивного аллостерического регулятора аденозиновых рецепторов. Предположительно активность катиона определяется наличием аминокислотных остатков глутамата-13, гистидина-278 (подтип A2) и аспартата-55 (подтип A1) [103]. Неясным остается вопрос о наличии специфического центра связывания для катиона на этих рецепторах, поскольку те же остатки в значительной степени определяют рецепторное взаимодействие лигандов. Более того, имеются указания на существование общего локуса для  $\text{Na}^+$  и специфических аллостерических регуляторов аденозиновых рецепторов, хотя их действие противоположно эффекту катиона [104].

Взаимодействие  $\text{Ca}^{2+}$  с кальций-связывающими комплексами в большинстве случаев можно рассматривать с позиций аллостерической регуляции. Мы уже указывали в таблице 2, что для функционирования рианодинного рецептора саркоплазматического ретикулама характерна отрицательная кооперативность, когда взаимодействие алкалоида рианодина с одним из четырех равноценных центров связывания затрудняет его последующую рецепцию [47]. Сходным образом действуют и ионы кальция; хотя активация канала рианодинного рецептора инициируется одновременным связыванием двух катионов  $\text{Ca}^{2+}$ , дальнейшая рецепция кальция соседними неактивными рецепторами затруднена, за счет имеющихся межрецепторных взаимодействий [105].

Кальций модифицирует связывание лигандов с дигидропиридиновым рецептором кальциевых каналов L-типа, являющихся точкой приложения активности распространенных в клинике антигипертензивных препаратов-блокаторов кальция: верапамила, дилтиазема и т.д.  $\text{Ca}^{2+}$  аллостерически стимулирует связывание как агонистов, так и антагонистов дигидропиридиновой природы [106]. Помимо этого, в присутствии катиона усиливается активность модулятора SR-7037, однако, по эффективности  $\text{Ca}^{2+}$ , в этом случае, уступает  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , а  $\text{Ba}^{2+}$  действует противоположным образом; одновременно ионы кальция ингибируют рецепцию фенилалкиламина D888 [107].

Для экстраклеточного кальциевого рецептора, состоящего из 7 трансмембранных доменов, аллостерическое влияние кальция не описано, хотя в распоряжении исследователей имеется позитивный аллостерический модулятор этих рецепторов NPS R-568 [108].

Функционирование одного из самых распространенных в тканях организма кальциевых каналов, активируемых рецепторами для инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3), зависит от внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , который способствует быстрому включению и медленной инактивации рецепторного комплекса [109]. При этом IP3 и  $\text{Ca}^{2+}$  взаимно аллостерически ингибируют связывание друг друга, уменьшая сродство к специфическим участкам [110]. Подобная динамика, характерная для типа I IP3-рецептора, не наблюдается у рецепторов типа III, демонстрирующих монотонно возрастающий ответ на ионы кальция [111]. На рекомбинантных IP3-рецепторах-III показано, что кальций вызывает повышение сродства собственных связывающих участков [112]. В основе действия катиона может лежать реорганизация функциональных доменов рецепторного комплекса, существующего в двух изоформах, различимых при электронной микроскопии, - квадратной и мельницевидной;  $\text{Ca}^{2+}$  сдвигает равновесие в сторону последней [113].

Возможность регуляции связывания лиганда путем взаимодействия с эффекторной субъединицей рецептора была описана для ионотропного рецептора каиновой кислоты, соединенного с кальциевым каналом.  $\text{Ca}^{2+}$  ингибировал рецепцию каината, снижая его сродство к глутаматному сайту [114]. Действие кальция не было специфичным, аналогичным эффектом обладали  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Co}^{2+}$ ,

тогда как активность  $Ba^{2+}$  и  $Sr^{2+}$  была выражена слабее; ингибирование каинатного рецептора катионом  $Ca^{2+}$  обращалось кадмием и лантаном.

Аналогично этому кальций вызывает ингибирование функциональной активности NMDA-рецепторов, взаимодействуя с центром, также связывающим некоторые вазодилататоры и противоишемические препараты, например, ифенпродил [115]. Полагают, что  $Ca^{2+}$  не только проникает через каналы, активируемые NMDA-рецепторами, но и модулирует сами рецепторы [116]. Это обстоятельство подчеркивается тем, что взаимодействие катиона с NMDA-рецепторным комплексом модифицирует связывание лигандов в отличном от глутаматного центра: рецепция МК-801 в фенициклидиновом локусе активируется  $Ca^{2+}$ , и этот эффект блокируется глицином [117].

Кальций способен не только аллостерически ингибировать, но и активировать рецепторы. Так, катион увеличивает сродство лигандов ГАМК<sub>B</sub>-рецептору, при этом его эффект не зависит от субъединичного состава рецепторного комплекса [118]. Некоторые эффекты мусцимола, ГАМК<sub>A</sub>-агониста могут проявляться только в присутствии  $Ca^{2+}$  [119]. Аллостерическое потенцирование кальцием функций N-холинорецепторов не является специфичным и также вызывается  $Ba^{2+}$ , и  $Sr^{2+}$  [120]. Кальций также, как и магний стимулирует высокоаффинное связывание лейкотриена В<sub>4</sub> мембранами легких морской свинки [68].

При исследовании действия двухвалентных катионов на функциональную активность ГАМК<sub>A</sub>-рецептора было обнаружено, что  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  (но не  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) вызывают ингибирование ГАМК-индуцированного тока анионов хлора: наименьшей эффективной концентрацией обладал  $Cd^{2+}$ , а максимальный эффект вызывал  $Zn^{2+}$  [121]. Поскольку цинк был активен только при внеклеточной аппликации, то это может свидетельствовать о наличии для  $Zn^{2+}$  специального связывающего центра, отличного от центров связывания других соединений-модуляторов. Впоследствии этот вывод был подтвержден другими исследователями. Так, было установлено, что для катионов цинка существует один связывающий центр, хотя популяция ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов может быть неоднородна в плане чувствительности к действию  $Zn^{2+}$  [122], при этом ингибирующий эффект цинка сопровождается увеличением как гиперполяризации, так и деполяризации мембран под действием ГАМК [123].

При исследовании пирамидальных клеток зоны CA1 гиппокампа была обнаружена функциональная гетерогенность ГАМК-рецепторов, отличающихся по чувствительности к ГАМК [124]. При этом нейроны также демонстрировали гетерогенность к ингибированию цинком, разделившись на 2 группы с IC<sub>50</sub> 28 и 182 мкМ. Эффективная концентрация  $Zn^{2+}$  при ингибировании ответа клеток зубчатого ядра составляла 29 мкМ, а для клеток культуры нейронов обонятельной луковицы - 17 мкМ [125]. Ингибирующий эффект цинка сохраняется при использовании рекомбинантных структур рецептора, содержащих ε-субъединицу или состоящих только из β3-субъединиц [126]. Аналогичным сродством, характерным для "дикой" популяции рецепторов, катионы цинка обладают по отношению к α1β2γ2-рецепторам [122]. Однако, если из состава такого рецептора исключается γ2-субъединица, происходит замена α1 на α4 или β2 на β3, сродство к  $Zn^{2+}$  возрастает более чем на порядок [127, 128]. Содержание животных на жидкой этаноловой диете приводит к некоторому повышению выраженности эффекта  $Zn^{2+}$ , при этом его эффективная концентрация не изменяется [129], однако, чувствительность ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов к катиону уменьшается с возрастом [130].

На гибридных клетках нейробластомы мыши-головного мозга китайского хомячка показано, что  $Zn^{2+}$  ингибирует активность соединений, взаимодействующих с глутаматным центром NMDA-рецептора [131]. В биохимических исследованиях установлено, что активность цинка, для которого обнаружен собственный участок связывания, обеспечивается по аллостерическому механизму [125, 132]. При этом, активность глицинового сайта рецептора не

#### АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

зависит от присутствия цинка [133]. В противоположность этому,  $Zn^{2+}$  способен аллостерически ингибировать связывание веществ с фенициклидиновым [117, 134] и полиаминовым участками [135]. На связывание собственно цинка позитивное влияние оказывает глутамат [136] и негативное  $Mg^{2+}$ , взаимодействующий с катионным каналом [137]. С помощью направленного мутагенеза установлено, что в поддержании структуры  $Zn^{2+}$ -связывающего центра NMDA-рецептора принимают участие аминокислотные остатки, кодируемые пятым экзоном: глутамат-181, 339, 342, аспарагин-616, аспартат-669, цистеин-744, 798 [138].

В отличие от глицинового сайта NMDA-рецептора  $Zn^{2+}$  действует как позитивный модулятор функциональной активности ингибиторного глицинового рецептора, сопряженного с хлорным каналом, при этом эффект катиона выявляется при использовании низких, не вызывающих десенситизацию рецептора концентраций медиатора [125]. Показано, что механизм действия цинка связан с его способностью увеличивать сродство активного центра рецептора к глицину, и этот эффект не зависит от величины потенциала покоя мембраны [139]. Для проявления активности существенное значение имеют аминокислотные остатки метионина-246 и лейцина-274 [140].

В отношении дофаминовых рецепторов показано, что  $Zn^{2+}$  аллостерически ингибирует связывание антагонистов с D1 и D2 подтипами, увеличивая скорость диссоциации лиганда из связывающего участка [141]. Аналогичные свойства катион проявляет на D4-рецепторах, при этом его сродство к рецепторному комплексу не изменяется при точечных заменах аспартата-77 на аспарагин или метионина-107 на валин, однако в первом случае способность цинка связываться с рецептором уменьшается на порядок в присутствии физиологических концентраций NaCl [98].

Активность цинка в отношении пуриновых рецепторов зависит от исследуемого подтипа. В экспериментах на рекомбинантных рецепторах выявлено, что  $Zn^{2+}$  проявляет свойства позитивного аллостерического модулятора P2X2 [142] и P2X4 рецепторов [143], тогда как на P2X7 он демонстрирует свойства негативного регулятора [144].

Существуют данные, что  $Zn^{2+}$  выступает в роли аллостерического антагониста тахикининовых NK-1 рецепторов. Авторы полагают, что эффект катиона обеспечивается нарушением межспиральных взаимодействий, характерных для ассоциированных с G-белком рецепторов, состоящих из семи трансмембранных доменов [145].

Установлено, что цинк связывается с внутриклеточными рецепторами. При этом связывающая цинк область этого суперсемейства рецепторов отличается консервативной структурой, а в связывании катиона принимает участие остаток лизина (лизин-461 в случае глюкокортикоидного рецептора). Лизин стабилизирует рецептор в неактивной конформации, а  $Zn^{2+}$ , взаимодействуя с аминокислотным остатком, усиливает функциональную активность гормонов [146].

Идея использовать элементы группы лантана для модификации действия биологически активных веществ возникла из результатов исследований, в которых тяжелые атомы использовались в качестве флуоресцентной метки при исследовании белков. Так, при изучении рецепции инсулина в гомогенной фазе с регистрацией флуоресценции тербия был установлен не только факт конформационных перестроек рецептора после взаимодействия с гормоном, но и стимуляция рецепторного взаимодействия в присутствии  $Tb^{3+}$ , эффективность которого была выше, чем у кальция [147]. Было постулировано, что участок рецептора, связывающий  $Ca^{2+}$  и  $Tb^{3+}$ , отличен от первичного активного центра. Дальнейшее изучение взаимоотношений  $Ca^{2+}$  и лантаноидов на уровне кальциевых рецепторов привело к заключению, что как для внутриклеточных, так экстраклеточных рецепторов характерно взаимодействие  $La^{3+}$  с кальций-связывающим сайтом, при этом определяющим сродство качеством иона является не специфичность, а плотность положительного заряда катиона [148, 149].

Оказывая модулирующее влияние на связывание лигандов этих рецепторов, лантан конкурирует с кальцием за собственные места связывания. Необходимо отметить, что сходство биохимических механизмов взаимодействия  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{La}^{3+}$  приводит к неодинаковым функциональным взаимоотношениям. Лантан выступает как антагонист кальция в системе дигидропиридинового [148, 150] и миметик для риадинового рецептора [149]. Реципрокные отношения между  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{La}^{3+}$  наблюдаются при изучении других рецепторных систем. Аллостерическое ингибирование рецепции каиновой кислоты кальцием предотвращается  $\text{La}^{3+}$ , также как и активирующий эффект  $\text{Ca}^{2+}$  на рецепцию АКТГ, в последнем случае активными являются также другие представители группы лантаноидов [151].

В литературе представлены данные о модуляции лантаном (и лантаноидами) ГАМК<sub>A</sub>-рецептора. В физиологических экспериментах лантаноиды потенцируют вызванный ГАМК перенос ионов  $\text{Cl}^-$ , стабилизируя рецептор в "открытом" состоянии, вероятно, за счет увеличения сродства медиатора [152]. Эффект сохраняется при использовании тканей животных после хронической алкоголизации [129]. Более того,  $\text{La}^{3+}$  и другие лантаноиды увеличивают сродство позитивных аллостерических модуляторов ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, таких как барбитураты и стероиды [139]. Полагают, что на рецепторном комплексе ГАМК<sub>A</sub> присутствует специфический участок для связывания лантаноидов [153]. При анализе субъединичного строения ГАМК<sub>A</sub>-рецептора была продемонстрирована значимость  $\alpha$ -субъединицы, при этом  $\alpha 4\beta 3\gamma$  химерный рецептор более эффективно взаимодействовал с лантаном, чем  $\alpha 4\beta 3\gamma 2$  [128]. С помощью сложных молекулярно-генетических манипуляций показана значимость как C-, так и N-концевого доменов  $\alpha$ -субъединицы для взаимодействия с  $\text{La}^{3+}$  [154].

Катионы металлов способны регулировать активность различных рецепторов, демонстрируя разнонаправленное действие в зависимости от типа связывающего участка. Наличие собственных центров связывания ионов, нередко взаимодействующих с целым рядом частиц, близких по размеру, строению электронного облака и плотности заряда, а также их эффективность в отношении разных рецепторов позволяют считать этот вид аллостерической регуляции самостоятельным, определяемым как "группоспецифическая".

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Значимость совокупных результатов по изучению аллостерической регуляции рецепторов для формирования научных представлений о функционировании рецепторных систем может быть проиллюстрирована на примере действия агонистов и антагонистов.

Наличие кооперативного взаимодействия предполагает возможность существования рецептора в конформационных состояниях, отличающихся сродством к лигандам. Теоретические построения в этом направлении привели к мнению о том, что рецептор может находиться в активной (доступной для связывания) и неактивной формах. Экспериментальными предпосылками для этих воззрений послужили результаты серии исследований, выполненных в фармацевтической компании ICI в Великобритании, по изучению серотониновых 5-HT<sub>2</sub>-рецепторов [например, 155]. Используя в физиологических экспериментах комбинации широкого спектра лигандов и модуляторов, авторы обосновали возможность существования активной и неактивной формы 5-HT<sub>2</sub>-рецепторов, способных к взаимопревращению за счет взаимодействия модуляторов в аллостерическом центре. Аналогичные данные были недавно получены в отношении 5-HT<sub>4</sub>-рецепторов с использованием направленного мутагенеза [156]. При исследовании кинетики термической инактивации рецептора было установлено, что выраженность аллостерической регуляции зависит от аминокислотной последовательности третьей внутриклеточной петли, тогда как соотношение активной и неактивной форм определяется C-концевым фрагментом макромолекулы.

Свидетельства о возможности существования рецепторов в активной и неактивной формах стимулировали сравнительное изучение рецепции агонистов и



### АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

антагонистов. Первоначально причину различий в действии агонистов и антагонистов исследователи искали в их различной липофильности и, следовательно, в облегченном или затрудненном проникновении лиганда к связывающему участку. Однако уже в середине 70-х годов прошлого века при анализе кинетики быстро и медленно действующих агонистов и антагонистов опиоидных рецепторов было сделано предположение, что взаимодействие с лигандом само по себе стабилизирует рецептор в конформации, предпочтительной для связывания агонистов или антагонистов [157]. В последующем это предположение подтвердилось, благодаря нескольким направлениям исследований: во-первых, результатам направленного мутагенеза и экспрессии рецепторов в гетерологических системах, во-вторых, данным о стабилизации рецептора в "агонистической" или "антагонистической" конформации при взаимодействии с лигандами, в-третьих, индукции конформационных изменений различными аллостерическими модуляторами.

При молекулярно-генетических исследованиях ГАМК<sub>A</sub>-рецептора было показано, что замена гистидина в позиции 101  $\alpha 1$ -субъединицы существенным образом сказывается на фармакологической активности бензодиазепиновых лигандов. Например, антагонистические свойства флунитразепама редуцировались при замене на лизин или глутамат, а инверсный агонист Ro15-4513 приобретал свойства антагониста *in vitro* при замене на тирозин или глутамин [158, 159]. С использованием "knock-in" мышей аналогичные результаты были получены *in vivo* при замене гистидина-101 на аланин [160]: авторы наблюдали появление у Ro15-4513 антиконвульсантной активности и способности подавлять локомоцию. Показана значимость остатка лейцина-99  $\beta 2$ -субъединицы для взаимодействия агонистов ГАМК с первичным связывающим центром рецептора и роль аспартата-95 в связывании конкурентных антагонистов [161]. Сопоставление кинетических и термодинамических данных привело некоторых авторов к заключению, что высокоаффинному связыванию антагонистов ГАМК (SR 95531 и биксукуллина) соответствует сверх-низкоаффинное связывание агонистов [162]. Существует предположение, что в основе различий в рецепции агонистов и антагонистов ГАМК лежит феномен молекулярной гетерогенности ГАМК<sub>A</sub>-бензодиазепинового комплекса, представляющего собой пентамер, формируемый субъединицами 16 различных типов с числом сочетаний более 55 тысяч [163].

Значимость аминокислотных остатков последовательности первых трех трансмембранных доменов аденозинового A1-рецептора была продемонстрирована при направленной замене на остатки аланина: глутамата-16 в первом трансмембранном домене (TM1) - вызывало снижение связывания агонистов на 1-2 порядка, тогда как аспартата-55 (TM2) - увеличение в 100 раз; при этом связывание антагонистов не изменялось. Замена серина-94 (TM3) приводила к снижению связывания антагонистов [103]. Другими авторами установлено, что замена треонина-277 на аланин приводит к существенному снижению аффинности агонистов A1-рецепторов [164].

Эффект, аналогичный действию агонистов, был обнаружен при изучении функций M1, M3 и M5 подтипов мускариновых рецепторов в условиях гиперэкспрессии G-белка [165]. Названный авторами феномен "конституционной" активности рецепторов обращался антагонистами и сопровождался усилением эффективности холиномиметиков вплоть до появления у парциальных агонистов свойств полных агонистов. При этом относительная аффинность соединений зависела от агонистических-антагонистических свойств вытесняемого лиганда. Описанные результаты соответствуют данным о существовании M-рецепторов в активном и неактивном состоянии, причем авторы проводят параллель с предпочтительным взаимодействием с агонистами или антагонистами. Между этими конформационными состояниями существует равновесие, на которое стабилизирующее влияние оказывает акт связывания с лигандом и которое может регулироваться G-белками.

Для N-холинорецепторов показана роль анионных остатков аспартата в связывании лигандов [166]. Если остаток 152  $\alpha$ -субъединицы задействован в узнавании катионных групп агонистов и антагонистов, то остатки 174 ( $\gamma$ -субъединица) и 180 ( $\delta$ -субъединица), главным образом, отвечают за рецепцию агонистов. Небезынтересно отметить, что эти данные свидетельствуют о наличии на никотиновом рецепторе, по крайней мере, двух связывающих центров. Различия в рецепции агонистов и антагонистов и формирование "агонистических" и "антагонистических" типов связывающих участков было продемонстрировано с использованием химерных никотиновых рецепторов, состоящих из  $\alpha$  и  $\delta$ -субъединиц [167].

Направленная мутация с заменой аспарагина-111 на аланин (TM3) ангиотензинового рецептора AT1A приводила к появлению агонистической активности у антагонистов ангиотензина II: [Sar1,Ile8]ангиотензина II (CGR 42112A) и [Sar1,Ala8]ангиотензина II, при этом наблюдалось усиление активности агонистов [168]. Авторы полагают, что основой выявленных феноменов является нарушение взаимодействия аспарагина-111 с находящимся в VII домене остатком тирозина-292, ответственным за взаимодействие с фосфолипидом C.

Значимость остатка серина-197 V трансмембранного домена D2 дофаминовых рецепторов для рецепции агонистов (но не антагонистов) была показана [169].

Приведенные примеры указывают на различия в строении связывающих участков рецепторов, взаимодействующих с агонистами и антагонистами в физиологических условиях. Можно полагать, что рецепторы предсуществуют в состояниях, предпочтительных для связывания этих фармакологических агентов. Вместе с тем, в литературе описаны данные об индукции агонистической-антагонистической конформации рецепторов после взаимодействия с лигандами.

Конформационные различия при взаимодействии с агонистами и антагонистами продемонстрированы для разных типов рецепторов. С помощью специфического тройного флуоресцентного зондирования было показано, что рекомбинантный р1 ГАМК-рецептор под действием агонистов приобретает конформацию, отличную от конформации, вызываемой конкурентными антагонистами [170]; более того, степень реорганизации рецепторной макромолекулы под действием агонистов (но не антагонистов) коррелирует с выраженностью функциональной активности рецептора. Связывание агонистов и антагонистов приводит к различным изменениям конформации внутриклеточного рецептора стероидных гормонов, и эти различия в существенной степени обеспечивают положительный или отрицательный эффект на экспрессию генов-мишеней [171]. В отношении нативных и рекомбинантных 5-HT<sub>3</sub>-рецепторов показано, что взаимодействие с агонистами увеличивает их сродство к некоторым антагонистам за счет стабилизации рецептора в "антагонистическом" состоянии [172].

Существование описанных сложных взаимоотношений между рецепцией агонистов и антагонистов делает правомерным вопрос об идентичности центров связывания лигандов с противоположной фармакологической активностью, тем более, что в пользу этого свидетельствуют результаты молекулярно-генетических экспериментов. На примере опиоидного рецептора  $\mu$ -типа были получены данные о том, что агонисты и антагонисты взаимодействуют с комплексами, различающимися по размеру [173]. Антагонисты связывались с рецептором, имеющим константу седиментации 10S ( $M_r = 230000$ ) и нечувствительным к действию гуанил-5-ил-имидодифосфата; тогда как агонисты - с чувствительным к аналогу GTP комплексом 12S ( $M_r = 300000$ ). Было выдвинуто предположение, что опиоидный рецептор может быть ассоциирован с G-белком, только присутствуя в агонистической конформации (но не в антагонистической).

Данные о различии рецепции агонистов и антагонистов связывающими участками одного и того же типа первоначально были подтверждены в термодинамическом исследовании сгирхнин-чувствительного глицинового рецептора [174]. В дальнейшем дискриминирующая роль температуры в кинетике

### АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

связывания агонистов и антагонистов была продемонстрирована в отношении рецепторов Т-лимфоцитов [175].

Индукированные лигандом конформационные изменения рецепторов, приводящие к появлению у них способности к альтернативному связыванию с агонистами или антагонистами, можно рассматривать как один из видов кооперативного взаимодействия. Известен феномен так называемого "непреодолимого антагонизма", при котором связавшийся с рецептором антагонист не может быть вытеснен из активного центра возрастающими концентрациями агониста. Полагают, что наблюдающееся в этом случае длительное существование комплекса "рецептор-антагонист" обеспечивается за счет аллостерических взаимодействий, при этом рецептор стабилизируется в "антагонистическом" состоянии в процессе изомеризации [176].

Выше мы уже приводили свидетельства того, что лиганд-рецепторное взаимодействие агонистов и антагонистов может по-разному регулироваться катионами металлов. Дополнительные свидетельства в пользу существования рецепторов в агонистической и антагонистической конформациях были получены с помощью специфических аллостерических регуляторов. Это явление впервые было описано нами в отношении опиоидных рецепторов. Лейкоцитарный  $\alpha$ -интерферон снижал уровень рецепции агониста морфина и повышал способность антагонистов связываться рецепторами [177]. Рекombинантный цитокин обладал более выраженным, действием [178].

В дальнейшем аналогичные данные были получены в отношении глицин-связывающего участка NMDA-рецепторов. Так, в условиях неравновесных кинетических экспериментов было показано, что эндогенный полиамин спермин увеличивает аффинитет глицина, но не его антагониста 7-хлоркинурената [179]. Аналогичным действием обладает антиконвульсант фелбамат, который также усиливает связывание глицина, но ингибирует рецепцию антагониста [180]. В свою очередь, глицин действует как негативный аллостерический модулятор рецепции в первичном (глутаматном) связывающем центре, когда в качестве лиганда используется специфический антагонист CGP39653 (D,L-(E)-2-амино-4-пропил-5-фосфоно-3-пентеновая кислота); при этом он повышает сродство NMDA-рецепторов к агонисту L-глутамату [181].

Взаимодействие лигандов с глициновым рецептором, сопряженным с хлорным каналом, также дискриминируется в зависимости от фармакологической активности лиганда. Если связывание антагонистов глицина не зависело от присутствия цинка, то активность агонистов усиливалась этим катионом, аллостерически взаимодействующим с N-концевой областью  $\alpha 1$ -субъединицы рецептора [182].

При исследовании влияния гептана-1,7-бис-(диметил-3'-фталимидопропиламмония бромида) было показано, что это соединение проявляет свойства негативного аллостерического регулятора по отношению к лигандам M2-холинорецепторов, однако выраженность регулирующего действия в 4 раза выше при тестировании агонистов по сравнению с антагонистами [183]. Противоположные свойства демонстрирует другой негативный модулятор - 8-(диэтиламино)октиловый эфир 3,4,5-триметоксибензойной кислоты, который более эффективно ингибирует рецепцию M2-антагонистов [64]. Под действием алкурония агонист пилокарпин приобретал свойства антагониста при исследовании сократительной способности левого предсердия и в тест-системе яичников китайского хомячка, трансфицированных M2-рецепторами [184]. Менее специфическое регулирующее действие по отношению к подтипам мускариновых рецепторов было обнаружено у производных пентациклического карбазалона, которые проявляли свойства негативного модулятора связывания ацетилхолина, и стимулировали связывание N-метилскополамина, при этом активность соединений уменьшалась в ряду подтипов рецепторов M2 > M1 > M4 > M3 [185].

Стабилизация агонист-рецепторного комплекса была обнаружена при

исследовании соединения PD 81,273 (производное 2-амино-3-бензоилтиофена), обладающего свойствами позитивного аллостерического регулятора аденозиновых рецепторов подтипа A1 [186]. Модулятор был эффективен как при радиолигандном тестировании, так и при оценке функциональной активности рецепторов, однако его действие не обнаруживалось при использовании антагонистов. При более детальном исследовании было подтверждено, что PD 81,273 обладает свойствами позитивного модулятора связывания агонистов, и обнаружена его активность как негативного модулятора связывания антагонистов/обратных агонистов [164]. Соединения, проявляющие свойства селективно усиливать связывание агонистов A3 аденозиновых рецепторов, были обнаружены в ряду производных 3-(2-пиридинил)-изохинолина [187]. При изучении структурно-функциональных взаимоотношений оказалось, что аллостерическая активность реализуется при наличии карбонильной группы в молекуле регулятора-кандидата. Аналогичные свойства были описаны для ряда производных 1H-имидазо[4,5-с]хинолина [188]. Кроме того, в литературе имеется единичное указание на возможность аллостерической дискриминации связывания агонистов и антагонистов  $\alpha_2$ -адренорецепторами [189]. Амилориды выступают в роли позитивных (для агонистов) и одновременно негативных (для антагонистов) модуляторов рецепторов этого типа.

Таким образом, взаимодействие агонистов и антагонистов с рецепторами подвержено многоуровневой регуляции, осуществляемой за счет структурных (строение связывающих центров) и функциональных (комплексообразование лиганд-рецептор и аллостерическая модуляция) компонентов.

Суммируя изложенные в обзоре данные, можно заключить, что функционирование рецепторных систем происходит с участием аллостерических процессов, физиологический смысл которых на сегодняшний день неясен. Среди них выделяются кооперативное взаимодействие, неспецифическая, функциональная и специфическая регуляция, рассмотрению которой будет посвящена вторая часть обзора.

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 Kumar S., Ma B., Tsai C.J., Wolfson H., Nussinov R. (1999) *Cell. Biochem. Biophys.*, **31**, 141-164
- 2 Gronemeyer H., Miturski R. (2001) *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **6**, 3-52.
- 3 Winkler W., Nahvi A., Breaker R.R. (2002) *Nature*, **419**, 952-956.
- 4 Welzenbach K., Hommel U., Weitz-Schmidt G. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 10590-10598.
- 5 Josephson K., Jones B.C., Walter L.J., DiGiacomo R., Indelicato S.R., Walter M.R. (2002) *Structure (Camb)*, **10**, 981-987.
- 6 Kukkonen J.P., Nasman J., Akerman K.E. (2001) *Trends Pharmacol. Sci.*, **22**, 616-622.
- 7 Barnakov A.N., Barnakova L.A., Hazelbauer G.L. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 42151-42156.
- 8 Braun V., Killmann H., Benz R. (1994) *FEBS Lett.*, **346**, 59-64.
- 9 Harman J.G. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1547**, 1-17.
- 10 Sanyal S., Kim J.Y., Kim H.J., Takeda J., Lee Y.K., Moore D.D., Choi H.S. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 1739-1748.
- 11 Fukuda K., Doggett T.A., Bankston L.A., Cruz M.A., Diacovo T.G., Liddington R.C. (2002) *Structure (Camb)*, **10**, 943-950.
- 12 Calzada M.J., Alvarez M.V., Gonzalez-Rodriguez J. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 39899-39908.
- 13 Coggeshall K.M. (1998) *Curr. Opin. Immunol.*, **10**, 306-312.
- 14 Haefely W., Kulcsar A., Mohler H. (1975) *Psychopharmacol Bull.*, **11**, 58-59.
- 15 Costa E., Guidotti A., Mao C.C. (1975) *Psychopharmacol Bull.*, **11**, 59-60.

# АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

- 16 Costa E. (1980) *Arzneimittelforschung.*, **30**, 858-861.
- 17 Nielsen M., Braestrup C. (1980) *Nature*, **286**, 606-607.
- 18 Costa E., Auta J., Grayson D.R., Matsumoto K., Pappas G.D., Zhang X., Guidotti A. (2002) *Neuropharmacology*, **43**, 925-937.
- 19 Karlin A. (1967) *J. Theor. Biol.*, **16**, 306-320.
- 20 Edelstein S.J. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1160-1165.
- 21 Thron C.D. (1973) *Mol. Pharmacol.*, **9**, 1-9.
- 22 Rodbard D., Bertino R.E. (1973) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **36**, 327-341.
- 23 Kardos J., Nyikos L. (2001) *Trends. Pharmacol. Sci.*, **22**, 642-645.
- 24 Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И. (1999) Рецепторы физиологически активных веществ. Волгоград, Семь ветров.
- 25 Madsen B.W., Yeo G.F. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **373**, 429-434.
- 26 Семке В.Я., Мельникова Т.Н., Бохан Н.А. (2002) *Ж. невропатол. психиатрии им. С.С.Корсакова*, **102**, 61-67.
- 27 Сторожко С.А., Панченко Л.Ф., Филиппович Ю.Д., Глушков В.С. (2001) *Вопр. мед. химии*, **47**, 198-208.
- 28 Klein R.L., Harris R.A. (1996) *Jpn. J. Pharmacol.*, **70**, 1-15.
- 29 Weight F.F., Li C., Peoples R.W. (1999) *Neurochem. Int.*, **35**, 143-152.
- 30 Klemm W.R. (1998) *Alcohol*, **15**, 249-267.
- 31 Cromer B.A., Morton C.J., Parker M.W. (2002) *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 280-287.
- 32 Davies D.L., Bejanian M., Parker E.S., Morland J., Bolger M.B., Brinton R.D., Alkana R.L. (1996) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 667-675.
- 33 Davies D.L., Bolger M.B., Brinton R.D., Finn D.A., Alkana R.L. (1999) *Psychopharmacology (Berl)*, **141**, 339-350.
- 34 Davies D.L., McCauley L.D., Bolger M.B., Alkana R.L. (2001) *Psychopharmacology (Berl)*, **157**, 401-410.
- 35 Viapiano M.S., Mitridate de Novara A.M., Fiszer de Plazas S., Bozzini C.E. (2001) *Brain Res.*, **894**, 31-36.
- 36 Ginsberg B.H., Kahn C.R., Roth J. (1977) *Endocrinology*, **100**, 82-90.
- 37 Zolman J.C., Valenta L.J. (1978) *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, **89**, 232-239.
- 38 De Meyts P., Van Obberghen E., Roth J. (1978) *Nature*, **273**, 504-509.
- 39 Heidmann T., Changeux J.P. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 889-896.
- 40 Saltiel A.R., Powell-Jones C.H., Thomas C.G. Jr, Nayfeh S.N. (1980) *Bioche. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 395-403.
- 41 Notides A.C., Lerner N., Hamilton D.E. (1981) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **78**, 4926-4930.
- 42 Persson R., Wohlfart C., Svensson U., Everitt E. (1985) *J. Virol.*, **54**, 92-97.
- 43 Wilhelm F., Ross F.P., Norman A.W. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.*, **249**, 88-94.
- 44 Yang J.S., Olsen R.W. (1987) *Mol. Pharmacol.*, **32**, 266-277.
- 45 Kaufman M., Pinsky L. (1989) *J. Steroid Biochem.*, **32**, 113-119.
- 46 Scanlon M.N., Koziarz P., Moore G.J. (1990) *Gen. Pharmacol.*, **21**, 59-65.
- 47 Pessah I.N., Zimanyi I. (1991) *Mol. Pharmacol.*, **39**, 679-689.
- 48 Biemann H.P., Koshland D.E. Jr. (1994) *Biochemistry*, **33**, 629-634.
- 49 Wikberg J.E. (1995) *Ann. NY Acad. Sci.*, **763**, 43-56.
- 50 Wu Z., Johnson K.W., Goldstein B., Choi Y., Eaton S.F., Laue T.M., Ciardelli T.L. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 16039-16044.
- 51 Arias H.R. (1996) *J. Neurosci. Res.*, **44**, 97-105.
- 52 Howlett A.C. (1998) *Neurobiol. Dis.*, **5**, 405-416.
- 53 Martynyuk A.E., Zima A., Seubert C.N., Morey T.E., Belardinelli L., Dennis D.M. (2002) *Basic Res. Cardiol.*, **97**, 295-304.
- 54 Bilmen J.G., Michelangeli F. (2002) *Cell Signal.*, **14**, 955-960.
- 55 Kolodziej A.F., Tan T., Koshland D.E. Jr. (1996) *Biochemistry*, **35**, 14782-14792.
- 56 Fu J.L., Donner D.B., Moore D.E., Hess G.P. (1977) *Biochemistry*, **16**, 678-684.
- 57 Demoliou-Mason C.D., Barnard E.A. (1986) *J. Neurochem.*, **46**, 1118-1128.

- 58 Onaran H.O., Costa T., Rodbard D. (1993) *Mol. Pharmacol.*, **43**, 245-256.
- 59 Mahle C.D., Wiener H.L., Yocca F.D., Maayani S. (1992) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **263**, 1275-1284.
- 60 Wang C.D., Gallaher T.K., Shih J.C. (1993) *Mol. Pharmacol.*, **43**, 931-940.
- 61 Alberts G.L., Chio C.L., Im W.B. (2001) *Mol. Pharmacol.*, **60**, 1349-1355.
- 62 Jagadeesh G., Cragoe E.J. Jr., Deth R.C. (1990) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **252**, 1184-1196.
- 63 Farrell C.B., O'Boyle K.M. (1994) *Eur. J. Pharmacol.*, **268**, 79-88.
- 64 Gnagey A., Ellis J. (1996) *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 1767-1775.
- 65 Butour J.L., Moisand C., Mazarguil H., Mollereau C., Meunier J.C. (1997) *Eur. J. Pharmacol.*, **321**, 97-103.
- 66 Vanderheyden P.M., Van Liefde I., De Backer J.P., Vauquelin G. (1997) *Eur. J. Pharmacol.*, **331**, 275-284.
- 67 Lau L.F., Pumiglia K., Cote Y.P., Feinstein M.B. (1994) *Biochem. J.*, **303**, 391-400.
- 68 Falcone R.C., Aharony D. (1991) *Eur. J. Pharmacol.*, **206**, 333-338.
- 69 Griffin G., Wray E.J., Martin B.R., Abood M.E. (1999) *Br. J. Pharmacol.*, **128**, 684-688.
- 70 Staudinger R., Wang X., Bandres J.C. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **286**, 41-47.
- 71 Arias H.R. (1999) *Neurosci Biobehav. Rev.*, **23**, 817-843.
- 72 Arias H.R., Blanton M.P. (2002) *Mini Rev. Med. Chem.*, **2**, 385-410.
- 73 Heidmann T., Changeux J.P. (1979) *Eur. J. Biochem.*, **94**, 281-296.
- 74 Palma A., Herz J.M., Wang H.H., Taylor P. (1986) *Mol. Pharmacol.*, **30**, 243-251.
- 75 Horio S., Nagare T., Ishida Y., Moritoki H. (1998) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **286**, 221-227.
- 76 Miller K.W. (2002) *Br. J. Anaesth.*, **89**, 17-31.
- 77 Husain S.S., Forman S.A., Kloczewiak M.A., Addona G.H., Olsen R.W., Pratt M.B., Cohen J.B., Miller K.W. (1999) *J. Med. Chem.*, **42**, 3300-3307.
- 78 Krebs M.O. (1992) *Encephale*, **18**, 271-279.
- 79 Tsuda K., Tsuda S., Goldstein M., Nishio I., Masuyama Y. (1996) *Neurochem. Int.*, **29**, 231-237.
- 80 Brackett R.L., Pouw B., Blyden J.F., Nour M., Matsumoto R.R. (2000) *Neuropharmacology*, **39**, 407-418.
- 81 Rogawski M.A., Donevan S.D. (1999) *Adv. Neurol.*, **79**, 947-963.
- 82 Lees G.J. (2000) *Drugs*, **59**, 33-78.
- 83 Im W.B., Pregenzer J.F., Thomsen D.R. (1994) *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 1025-1030.
- 84 Drewe J.A., Chen J.S., Reyes A.A., Lan N.C. (1995) *Life Sci.*, **57**, 1175-1182.
- 85 Pomes A., Rodriguez-Farre E., Sunol C. (1994) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 1616-1623.
- 86 Holemans S., Feron O., Octave J.N., Maloteaux J.M. (1995) *Neurosci. Lett.*, **183**, 183-186.
- 87 Tanizawa Y., Matsuda K., Matsuo M., Ohta Y., Ochi N., Adachi M., Koga M., Mizuno S., Kajita M., Tanaka Y., Tachibana K., Inoue H., Furukawa S., Amachi T., Ueda K., Oka Y. (2000) *Diabetes*, **49**, 114-120.
- 88 Zhu Q.L., He H.M., Xiao W.B., Wang H. (2001) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **37**, 522-531.
- 89 Pert C.B., Snyder S.H. (1974) *Mol. Pharmacol.*, **10**, 868-879.
- 90 Simon E.J., Groth J.T. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2404-2407.
- 91 Ott S., Costa T., Herz A. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 10524-10533.
- 92 Frances B., Moisand C., Meunier J.C. (1985) *Eur. J. Pharmacol.*, **117**, 223-232.
- 93 Балашов А.М., Петриченко О.Б., Алябьева Т.Н., Панченко Л.Ф. (1988) *Биохимия*, **53**, 1527-1531.
- 94 Cheney B.V., Lahti R.A. (1987) *Life Sci.*, **40**, 1071-1074.
- 95 Zajac J.M., Roques B.P. (1985) *J. Neurochem.*, **44**, 1605-1614.
- 96 Van der Weide J., De Vries J.B., Tepper P.G., Horn A.S. (1987) *Eur. J.*

# АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

- Pharmacol., **143**, 101-117.
- 97 Javitch J.A., Kaback J., Li X., Karlin A. (1994) J. Recept. Res., **14**, 99-117.
- 98 Schetz J.A., Sibley D.R. (2001) J. Pharmacol. Exp. Ther., **296**, 359-363.
- 99 Eshleman A.J., Calligaro D.O., Eldefrawi M.E. (1993) Membr. Biochem., **10**, 129-144.
- 100 Showalter V.M., Compton D.R., Martin B.R., Abood M.E. (1996) J. Pharmacol. Exp. Ther., **278**, 989-999.
- 101 Howard M.J., Hughes R.J., Motulsky H.J., Mullen M.D., Insel P.A. (1987) Mol. Pharmacol., **32**, 53-58.
- 102 Horstman D.A., Brandon S., Wilson A.L., Guyer C.A., Cragoe E.J. Jr., Limbird L.E. (1990) J. Biol. Chem., **265**, 21590-21595.
- 103 Barbhuiya H., McClain R., Ijzerman A., Rivkees S.A. (1996) Mol. Pharmacol., **50**, 1635-1642.
- 104 Gao Z.G., Jiang Q., Jacobson K.A., Ijzerman A.P. (2000) Biochem. Pharmacol., **60**, 661-668.
- 105 Stern M.D., Song L.S., Cheng H., Sham J.S., Yang H.T., Boheler K.R., Rios E. (1999) J. Gen. Physiol., **113**, 469-489.
- 106 Kanngiesser U., Pongs O. (1989) Eur. J. Biochem., **181**, 467-473.
- 107 Rossier J.R., Cox J.A., Niesor E.J., Bentzen C.L. (1989) J. Biol. Chem., **264**, 16598-16607.
- 108 Hu J., Reyes-Cruz G., Chen W., Jacobson K.A., Spiegel A.M. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 46622-46631.
- 109 Laurent M., Claret M. (1997) J. Theor. Biol., **186**, 307-326.
- 110 Hirose K., Kadowaki S., Iino M. (1998) J. Physiol., **506**, 407-414.
- 111 Hagar R.E., Burgstahler A.D., Nathanson M.H., Ehrlich B.E. (1998) Nature, **396**, 81-84.
- 112 Mak D.O., McBride S., Foskett J.K. (2001) J. Gen. Physiol., **117**, 447-456.
- 113 Hamada K., Miyata T., Mayanagi K., Hirota J., Mikoshiba K. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 21115-21118.
- 114 Braitman D.J., Coyle J.T. (1987) Neuropharmacology, **26**, 1247-1251.
- 115 Legendre P., Westbrook G.L. (1991) Mol. Pharmacol., **40**, 289-298.
- 116 Liu Y., Zhang J. (2000) Chin. Med. J. (Engl), **113**, 948-956.
- 117 Hubbard C.M., Redpath G.T., Macdonald T.L., VandenBerg S.R. (1989) Brain Res., **486**, 170-174.
- 118 Green A., Walls S., Wise A., Green R.H., Martin A.K., Marshall F.H. (2000) Br. J. Pharmacol., **131**, 1766-1774.
- 119 Williams B., Bence M., Everest H., Forrest-Owen W., Lightman S.L., McArdle C.A. (2000) J. Neuroendocrinol., **12**, 159-166.
- 120 Mülle C., Lena C., Changeux J.P. (1992) Neuron, **8**, 937-945.
- 121 Celentano J.J., Gyenes M., Gibbs T.T., Farb D.H. (1991) Mol. Pharmacol., **40**, 766-773.
- 122 Gingrich K.J., Burkat P.M. (1998) J. Physiol., **506**, 609-625.
- 123 Patenaude C., Nurse S., Lacaille J.C. (2001) Synapse, **41**, 29-39.
- 124 Tietz E.I., Kapur J., Macdonald R.L. (1999) J. Neurophysiol., **81**, 1575-1586.
- 125 Trombley P.Q., Shepherd G.M. (1996) J. Neurophysiol., **76**, 2536-2546.
- 126 Neelands T.R., Fisher J.L., Bianchi M., Macdonald R.L. (1999) Mol. Pharmacol., **55**, 168-178.
- 127 Barberis A., Petrini E., Cherubini E., Mozrzymas J. (2002) Neuropharmacology, **43**, 607-618.
- 128 Brown N., Kerby J., Bonner T.P., Whiting P.J., Wafford K.A. (2002) Br. J. Pharmacol., **136**, 965-974.
- 129 Frye G.D., Fincher A.S., Grover C.A., Jayaprabhu S. (1996) Brain Res., **720**, 101-110.
- 130 Hsiao S.H., West J.R., Mahoney J.C., Frye G.D. (1999) Brain Res., **832**, 124-135.
- 131 Lerma J., Kushner L., Spray D.C., Bennett M.V., Zukin R.S. (1989) Proc. Natl.

- Acad. Sci. USA, **86**, 1708-1711.
- 132 Mayer M.L., Vyklicky L. Jr., Westbrook G.L. (1989) J. Physiol., **415**, 329-350.
- 133 Reynolds I.J., Miller R.J. (1990) Adv. Pharmacol., **21**, 101-126.
- 134 Guilarte T.R., Miceli R.C., Jett D.A. (1995) Neurotoxicology, **16**, 63-71.
- 135 Berger M.L., Rebernik P. (1999) J. Pharmacol. Exp. Ther., **289**, 1584-1591.
- 136 Zheng F., Erreger K., Low C.M., Banke T., Lee C.J., Conn P.J., Traynelis S.F. (2001) Nat. Neurosci., **4**, 894-901.
- 137 Cazin M., Luyckx M., Brunet C., Meresse C. (1991) J. Pharm. Belg., **46**, 100-106.
- 138 Traynelis S.F., Burgess M.F., Zheng F., Lyuboslavsky P., Powers J.L. (1998) J. Neurosci., **18**, 6163-6175.
- 139 Kumamoto E., Murata Y.J. (1996) Neurophysiol., **76**, 227-241.
- 140 Lynch J.W., Jacques P., Pierce K.D., Schofield P.R. (1998) J. Neurochem., **71**, 2159-2168.
- 141 Schetz J.A., Sibley D.R. (1997) J. Neurochem., **68**, 1990-1997.
- 142 Wildman S.S., King B.F., Burnstock G. (1998) Br. J. Pharmacol., **123**, 1214-1220.
- 143 Miller K.J., Michel A.D., Chessell I.P., Humphrey P.P. (1998) Neuropharmacology, **37**, 1579-1586.
- 144 Virginio C., Church D., North R.A., Surprenant A. (1997) Neuropharmacology, **36**, 1285-1294.
- 145 Elling C.E., Nielsen S.M., Schwartz T.W. (1995) Nature, **374**, 74-77.
- 146 Starr D.B., Matsui W., Thomas J.R., Yamamoto K.R. (1996) Genes Dev., **10**, 1271-1283.
- 147 Williams P.F., Turtle J.R. (1984) Diabetes, **33**, 1106-1111.
- 148 Zernig G., Reider N. (1992) Mol. Pharmacol., **41**, 45-52.
- 149 Riccardi D. (2002) Exp. Physiol., **87**, 403-411.
- 150 Curtis B.M., Catterall W.A. (1986) Biochemistry, **25**, 3077-3083.
- 151 Enyeart J.J., Xu L., Enyeart J.A. (2002) Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., **282**, E1255-1266.
- 152 Ma J.Y., Reuveny E., Narahashi T. (1994) J. Neurosci., **14**, 3835-3841.
- 153 Kumamoto E. (1997) Prog. Neurobiol., **52**, 197-259.
- 154 Fisher J.L., Zhang J., Macdonald R.L. (1997) Mol. Pharmacol., **52**, 714-724.
- 155 Kaumann A.J. (1988) J. Cardiovasc. Pharmacol., **11**, 88-92.
- 156 Claeysen S., Sebben M., Becamel C., Parmentier M.L., Dumuis A., Bockaert J. (2001) EMBO Rep., **2**, 61-67.
- 157 Kosterlitz H.W., Leslie F.M., Waterfield A.A. (1975) Eur. J. Pharmacol., **32**, 10-16.
- 158 Davies M., Bateson A.N., Dunn S.M. (1998) J. Neurochem., **70**, 2188-2194.
- 159 Dunn S.M., Davies M., Muntoni A.L., Lambert J.J. (1999) Mol. Pharmacol., **56**, 768-774.
- 160 Crestani F., Assandri R., Tauber M., Martin J., Rudolph U. (2002) Neuropharmacology, **43**, 679.
- 161 Boileau A.J., Newell J.G., Czajkowski C. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 2931-2937.
- 162 Maksay G. (1996) Neurochem. Int., **29**, 361-370.
- 163 De Blas A.L. (1996) Mol. Neurobiol., **12**, 55-71.
- 164 Kourounakis A., Visser C., de Groote M., Ijzerman A.P. (2001) Biochem. Pharmacol., **61**, 137-144.
- 165 Burstein E.S., Spalding T.A., Brann M.R. (1997) Mol. Pharmacol., **51**, 312-319.
- 166 Osaka H., Sugiyama N., Taylor P. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 12758-12765.
- 167 Curtis L., Chiodini F., Spang J.E., Bertrand S., Patt J.T., Westera G., Bertrand D. (2000) Eur. J. Pharmacol., **393**, 155-163.
- 168 Groblewski T., Maigret B., Languier R., Lombard C., Bonnafous J.C., Marie J. (1997) J. Biol. Chem., **272**, 1822-1826.
- 169 Woodward R., Coley C., Daniell S., Naylor L.H., Strange P.G. (1996) J. Neurochem., **66**, 394-402.
- 170 Chang Y., Weiss D.S. (2002) Nat. Neurosci., **5**, 1163-1168.
- 171 Beato M., Klug J. (2000) Hum. Reprod. Update, **6**, 225-236.



# АЛЛОСТЕРИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

- 172 Bonhaus D.W., Stefanich E., Loury D.N., Hsu S.A., Eglen R.M., Wong E.H. (1995) *J. Neurochem.*, **65**, 104-110.
- 173 Jauzac P., Frances B., Puget A., Moisand C., Meunier J.C. (1986) *J. Recept. Res.*, **6**, 1-25.
- 174 Ruiz-Gomez A., Garcia-Calvo M., Vazquez J., Marvizon J.C., Valdivieso F., Mayor F. Jr. (1989) *J. Neurochem.*, **52**, 1775-1780.
- 175 Alam S.M., Davies G.M., Lin C.M., Zal T., Nasholds W., Jameson S.C., Hogquist K.A., Gascoigne N.R., Travers P.J. (1999) *Immunity*, **10**, 227-237.
- 176 Vauquelin G., Van Liefde I., Vanderheyden P. (2002) *Trends Pharmacol. Sci.*, **23**, 514-518.
- 177 Алябьева Т.Н., Балашов А.М., Панченко Л.Ф. (1988) *Нейрохимия*, **7**, 73-77.
- 178 Панченко Л.Ф., Алябьева Т.Н., Малиновская В.В., Балашов А.М. (1987) *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **104**, 87-89.
- 179 Marvizon J.C., Baudry M. (1994) *Eur. J. Pharmacol.*, **269**, 165-175.
- 180 McCabe R.T., Sofia R.D., Layer R.T., Leiner K.A., Faull R.L., Narang N., Wamsley J.K. (1998) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **286**, 991-999.
- 181 Mugnaini M., Meoni P., Bunnemann B., Corsi M., Bowery N.G. (2001) *Br. J. Pharmacol.*, **132**, 1883-1897.
- 182 Laube B., Kuhse J., Betz H. (2000) *J. Physiol.*, **522**, 215-230.
- 183 Lanza fame A., Christopoulos A., Mitchelson F. (1996) *Eur. J. Pharmacol.*, **316**, 27-32.
- 184 Zahn K., Eckstein N., Trankle C., Sadee W., Mohr K. (2002) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **301**, 720-728.
- 185 Gharagozloo P., Lazareno S., Miyauchi M., Popham A., Birdsall N.J. (2002) *J. Med. Chem.*, **45**, 1259-1274.
- 186 Bhattacharya S., Linden J. (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, **1265**, 15-21.
- 187 Gao Z.G., Van Muijlwijk-Koezen J.E., Chen A., Muller C.E., Ijzerman A.P., Jacobson K.A. (2001) *Mol. Pharmacol.*, **60**, 1057-1063.
- 188 Gao Z.G., Kim S.G., Soltysiak K.A., Melman N., Ijzerman A.P., Jacobson K.A. (2002) *Mol. Pharmacol.*, **62**, 81-89.
- 189 Leppik R.A., Birdsall N.J. (2000) *Mol. Pharmacol.*, **58**, 1091-1099.

Поступила 02.06.03

## ALLOSTERIC REGULATION OF RECEPTORS. I. COOPERATIVE INTERACTION AND FUNCTIONAL REGULATION.

A.M.Balashov<sup>1</sup>, L.F.Panchenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Moscow Scientific Research Institute for Psychiatry, Ministry of Health of Russia,

<sup>2</sup>Scientific Research Institute for Abuse, Ministry of Health of Russia

ul. Potesnaya, 3, 107076 Moscow, Russia; tel./fax: +7 095 963 7249; e-mail: ambal1007@mtu-net.ru

Today thousands of scientific publications in the field of receptology are dedicated to allosteric regulation of receptors. Biochemical events in cardiovascular, nerve, immune, endocrine, and other systems are based on various allosteric processes. Many of pharmaceuticals exert their action via allosteric regulation of receptive structures. Unfortunately, original publications sometimes are rather fragmentary.

The history, methodology, classification as well as functional aspects of allosteric regulation of receptors are reviewed in the present paper. On the basis of topography of orthosteric and allosteric receptor binding sites allosteric regulation may be subdivided into: specific, non-specific, functional, and cooperative interaction. The results of allosteric regulation of receptors by metal cations are summarized. Agonists and antagonists receptor interaction are described from the point of view of allosteric regulation.

**Key words:** receptors, allosteric regulation, cooperative interaction.